

09/868474

JC03 RES POT/ETC 15 JUN 2001

09/868474

대한민국 특허청
KOREAN INDUSTRIAL
PROPERTY OFFICE

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Industrial
Property Office.

출원번호 : 특허출원 1999년 제 44811 호
Application Number

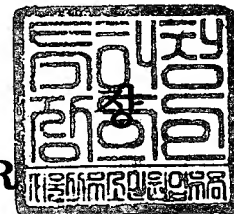
출원년월일 : 1999년 10월 15일
Date of Application

출원인 : 김진우
Applicant(s)

2000 년 12 월 18 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 1999.10.15
【발명의 명칭】 신규 발암유전자 에이치씨씨알1 및 이에 의해 코드되는 단백질
【발명의 영문명칭】 NOVEL ONCOGENE HCCR1 AND PROTEIN ENCODED THEREIN
【출원인】
【성명】 김진우
【출원인코드】 4-1998-704169-5
【대리인】
【성명】 나영미
【대리인코드】 9-1998-000173-2
【대리인】
【성명】 장성구
【대리인코드】 9-1998-000514-8
【발명자】
【성명】 김진우
【출원인코드】 4-1998-704169-5
【미생물기탁】
【기탁기관명】 생명공학연구소 유전자은행
【수탁번호】 KCTC 0667BP
【수탁일자】 1999.10.11
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 002
【서열목록의 전자문서】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대
리인 나영
미 (인) 대리인
장성구 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 32 면 32,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 0 항 0 원

1019990044811

2000/12/1

【합계】	61,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면후 수수료】	18,300 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 신규 발암 유전자인 HCCR1(human cervical cancer receptor 1) 및 이에 의해 코드되는 단백질에 관한 것으로, 본 발명의 발암유전자 HCCR1은 기존의 보고된 발암유전자와는 전혀 상동성을 나타내지 않는 신규 유전자로서 자궁경부암과 폐암을 비롯한 암의 진단, 형질전환 동물의 제조 및 안티-센스(anti-sense) 유전자치료 등에 효과적으로 이용될 수 있다.

【대표도】

도 6

【명세서】

【발명의 명칭】

신규 발암유전자 에이치씨씨알1 및 이에 의해 코드되는 단백질{NOVEL ONCOGENE HCCR1 AND PROTEIN ENCODED THEREIN}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 정상 자궁경부 조직, 자궁암조직 및 자궁경부암 세포주 (CaSki, CUMC-6)들에서 HCCR1 발암유전자의 발현여부를 확인한 노던 블롯 분석 결과를 나타낸 것이며;

도 2는 정상 폐 조직 및 폐암 세포주 (H358, H460, H441, H1299, H520, H2009, H157)들에서 HCCR1 발암유전자의 발현여부를 확인한 노던 블롯 분석 결과를 나타낸 것이며;

도 3은 HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포의 단층배양시 성장양상을 위상차 현미경으로 관찰한 것이며;

도 4는 HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포를 단층배양한 후 헤마톡실린-에오신으로 염색하여 세포의 형태학적 특성을 관찰한 것이며;

도 5a 및 5b는 HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포를 단층배양한 후 투과 전자현미경으로 세포 및 세포내 소기관의 형태학적 특성을 각각 관찰한 것이며;

도 6은 누드마우스에서 HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포의 종양형성능을 확인한 것이며;

도 7은 누드마우스에서 HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포에 의해 형성된 종괴의 형태학적 특성을 광학현미경으로 확인한 것이며;

도 8은 HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포를 누드마우스에서 성장시킨 후 형성된 종괴를 적출하여 투과 전자현미경으로 세포 및 세포내 소기관의 형태학적 특성을 각각 관찰한 것이며;

도 9는 HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포에 의해 누드마우스에서 형성된 종괴로부터 확립된 암 세포주의 성장양상을 위상차 현미경으로 관찰한 것이며;

도 10은 HCCR1 발암유전자를 대장균에 형질도입시킨 후 발현되는 단백질의 크기를 소듐 도데실 설페이트(SDS) 아가에서 전기영동하여 확인한 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<11> 인간을 포함한 고등동물들은 약 100,000 개의 유전자들을 갖고 있으나 이들중 약 15% 만이 각각의 개체에서 발현된다. 따라서, 어떠한 유전자가 선택되어 발현되느냐에 따라서 생명의 모든 현상, 즉 발생, 분화, 항상성(homeostasis), 자극에 대한 반응, 세포분열 주기조절, 노화, 및 아포토시스(apoptosis; programmed cell death)등이 결정된다(Liang, P. and A. B. Pardee, *Science*, 257: 967-971(1992)).

<12> 이와 같이 정상세포의 발달과정뿐만 아니라 종양과 같은 병리학적인 현상도 단일 또는 여러 종류의 유전자 변이과정으로 유발되어 결국에는 유전자 발현의 변화를 유도하게

된다. 따라서 상이한 세포들 사이에서 나타나는 유전자 발현들의 비교는 여러 생물학적 현상을 이해하는데 기본적이고 효과적인 접근방법이라고 할 수 있다.

<13> 리앙과 파디(Liang and Pardee, 상기 문헌 참조) 등은 정상 위점막세포와 위암세포에서 서로 다르게 발현되는 유전자를 비교분석하기 위하여 mRNA 감별전개(differential display) 방법을 고안하였는데 이 방법은 현재 종양억제 유전자나 세포분열 주기(cell cycle)에 관련된 유전자 및 apoptosis 에 관련된 전사조절 유전자(transcriptional regulatory gene) 등의 탐색에 효과적으로 이용되고 있으며 또한 하나의 세포에서 일어나는 다양한 유전자들의 상호 관련성의 규명에도 다양하게 활용되고 있다.

<14> 종양발생에 대한 여러 연구결과들을 종합하여 보면 특정 염색체부위의 소실(loss of chromosomal heterozygosity), 발암유전자들의 활성화 및 p53 유전자를 포함한 다른 종양억제 유전자들의 불활성화 등과 같은 여러 가지 유전적 변화들이 종양조직에 축적되어 인간종양을 일으킨다고 보고되었다(Bishop, J. M., *Cell*, 64: 235-248(1991); 및 Hunter, T., *Cell*, 64: 249-270(1991)). 이 중에서도 p53 종양억제 유전자의 변이가 암을 일으키는 유전적 변화들 중 가장 중요하게 작용하고 있는 것으로 보고되고 있다.

<15> 그러나, p53 종양억제 유전자의 변이 빈도에 있어서 자궁경부암은 다른 종양들의 높은 변이 빈도, 즉 대장암의 약 75%, 유방암의 약 40%, 폐암의 약 50%(Hollstein, M. *et al.*, *Science*, 253: 49-53(1991a); Levine, A. J. *et al.*, *Nature*, 351: 453-456(1991))와는 달리 단지 2-11 % 정도로 아주 낮게 보고되고 있다(Borresen, A. L. *et al.*, *Lancet*, 339: 1350-1351(1992)); Crook, T. D. *et al.*, *Lancet*, 339: 1070-1073(1992)); Fujita, M.

et al., *Cancer Res.*, 52 : 5323-5328(1992)); Helland, Å. *et al.*, *J Pathol.*, 171: 105-114(1993)); Kessis, T. D. *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 143: 1398-1405(1993)); Busby-Earle, R. *et al.*, *Br. J. Cancer*, 69: 732-737(1994)); Park, D. *et al.*, 9: 205-210(1994)); 및 Miwa, K. *et al.*, *Br. J. Cancer.*, 71: 219-226(1995)).

<16> 또한, 자궁경부암의 경우 p53 종양억제 유전자 기능의 소실은 고위험군(high risk) 인유두종 바이러스(human papilloma virus; HPV)들의 E6 단백질과 p53 유전자의 단백질이 복합체를 이루어 결국 p53 유전자의 불활성화를 초래하게 된다고 보고되어 (Scheffner, M. *et al.*, *Cell*, 63: 1129-1136(1990); 및 Scheffner, M. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 5523-5527(1991)) 자궁경부암 조직과 세포주들에서 HPV 음성인 경우는 단지 변이형(mutant-type) p53 유전자들만이 발견되고 HPV 양성인 경우에는 야생형(wild-type) p53 유전자들만이 검출된다고 보고되었다(Crook T. *et al.*, *J. Virol.*, 65: 505-510(1991a) 및 상기 문헌(1992)). 그러나, 푸지타(Fujita) 등(상기 문헌, 1992)은 36예의 원발성 자궁경부암을 분석한 결과 p53 유전자 변이는 오직 HPV 양성인 2예에서만 발견되었으며 7예의 HPV 음성인 암에서는 변이가 없었다고 하여 크룩(Crook) 등(상기 문헌, 1992)의 결과와 상반된 결과를 보고하였으며 다른 연구 결과들(Borresen *et al.*, 상기 문헌, 1992; Helland *et al.*, 상기 문헌, 1993)에서도 HPV 양성인 경우 p53 유전자 변이가 동반되었고 HPV 음성인 조직의 경우 p53 유전자 변이는 찾을 수 없었다.

<17> 또한, 한국인 여성 자궁암 조직 및 종양세포주들을 대상으로 실시한 연구결과(Kim, J. W.

et al., *Acta Oncol.*, 36: 295-300(1997))에서도 Fujita 등(상기 문헌, 1992), Helland 등(상기 문헌, 1993)과 일치하여 HPV 양성인 경우 p53 유전자 변이가 동반되었고 HPV 음성인 조직의 경우 p53 유전자 변이는 찾을 수 없었다.

<18> 따라서, HPV 음성인 자궁경부암들의 경우 p53 유전자의 불활성화가 자궁경부암의 암 발생 기전에 대한 필수적 요건은 아니며, p53 유전자에 의존하지 않는 또다른 기전으로 종양이 진행된다고 분석할 수 있다. 즉 p53 유전자의 변이나 HPV 감염이 없이 발생하는 자궁경부암들의 경우 p53 유전자와 전혀 다른 새로운 종양관련 유전자들에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

<19> p53 유전자외에 종양발생과 관련된 여러 원인 인자들 중 발암유전자들의 활성화가 인체 악성 종양들의 약 10-30 %에서 확인되고 있으며(Slamon, D. J. *et al.*, *Science*, 224: 256-262(1984)), 이러한 발암유전자의 활성화는 주로 원암유전자(protooncogene)의 증폭(amplification)에 의하여 발생하며, 이외에도 원암유전자의 여러가지 구조적 변화에 의해서도 나타난다. 자궁경부암의 경우에서도 보고된 발암유전자들인 *c-myc*, *Ha-ras*, 및 *erb-2* 유전자들의 활성화 등 변이들이 보고되고 있으나 아직까지도 자궁경부암에 특이하게 나타나는 단일 발암유전자의 변이는 보고되어 있지 않다(Ocadiz, R. R. *et al.*, *Cancer Res.*, 47: 4173-4177(1987); Riou, G. M. *et al.*, *Lancet*, 4: 761-763(1987); Sagae, S. *et al.*, *Cancer*, 63: 1577-1582(1989); Sagae, S. R. *et al.*, *Cancer*, 66: 295-301(1990); Gotoh, M. *et al.*, *Jpn. J. Cncer Res.*, 82: 1252-1257(1991); Pinion, S. B. *et al.*, *Lancet*, 337: 819-820(1991); Iwasaka, T. *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 46: 298-303(1992).

<20> 즉, 현재까지 알려져있는 분자유전학 수준에서 자궁경부암의 발생기전을 파악해내

기에는 미흡한 실정이나, 한국여성들에서 종양과 관련되어 가장 높은 사망율을 차지하고 있으며(통계청: 사망원인 통계연보(인구동태 신고에 의한 집계), 13: 48(1992), 전이 및 재발이 된 경우 기존의 치료적 수단으로는 질환의 경과를 기대할 수 없는 자궁경부암에 대한 새로운 분자유전학적 접근 방식은 필수적으로 요구되고 있다.

<21> 이에 본 발명자들은 자궁경부암의 발생기전을 발암 유전자 수준에서 접근하여 자궁경부암에만 특이하게 나타나는 유전자를 발견하여 그 결과를 향후 여러 암종들의 유전자 치료에 이용하고자 순수 한국인 자궁경부암 환자에서 확립시킨 종양세포주, 자궁경부암 조직, 전이암 조직, 정상 자궁경부 조직들로부터 mRNA를 각각 추출하여 서로 달리 나타나는 유전자 발현들의 차이를 감별 전개 역전사 중합효소 연쇄반응(Differential display reverse transcription-PCR; DDRT-PCR) 방법으로 비교 분석하여 정상 조직들에서는 발현이 되지 않고 종양세포주, 종양조직 및 전이종양조직들에서만 특이하게 발현되는 발암 유전자를 규명하여 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<22> 본 발명의 목적은 신규 발암유전자 및 그의 단편을 제공하는 것이다.

<23> 본 발명의 다른 목적은 상기 발암유전자 또는 그의 단편을 포함하는 재조합 벡터 및 이에 의해 형질전환된 미생물을 제공하는 것이다.

<24> 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발암유전자에 의해 코드되는 단백질 및 그의 단편을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <25> 본 발명의 신규 발암유전자(oncogene)인 인간 자궁경부암 수용체 1형(human cervical cancer receptor 1; HCCR1)은 자궁경부암과 폐암 조직들에서 특이하게 발현되고, 서열번호: 1로 나타낸 바와 같은 2118 bp 길이의 전체 염기서열을 가진다. 서열번호: 1의 염기서열에서, 뉴클레오티드 번호 9 내지 1088 부위가 단백질 코딩 영역이고, 뉴클레오티드 번호 9 내지 83 부위는 시그널 펩타이드(signaling peptide)를 코드하며, 뉴클레오티드 번호 435 내지 494 부위는 하나의 막통과 도메인(single transmembrane domain)을 코드한다. 이로부터, 본 발명의 유전자는 막 수용체(membrane receptor) 유전자일 것으로 판단된다.
- <26> 그러나, 코돈의 축퇴성(degeneracy)으로 인해서 또는 상기 발암유전자를 발현시키고자 하는 생물에서 선호되는 코돈을 고려하여 본 발명의 발암유전자는 코딩영역으로부터 발현되는 발암단백질의 아미노산 서열을 변화시키지 않는 범위내에서 코딩영역에 다양한 변형이 이루어질 수 있고 코딩영역을 제외한 부분에서도 유전자의 발현에 영향을 미치지 않는 범위내에서 다양한 변형 또는 수식이 이루어질 수 있으며, 그러한 변형 유전자 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명은 상기 발암유전자와 실질적으로 동일한 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 및 상기 유전자의 단편을 역시 포함한다. 실질적으로 동일한 폴리뉴클레오티드란 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미한다.
- <27> 본 발명의 발암 유전자로부터 발현되는 단백질은 360개의 아미노산으로 이루어져 있고 서열번호: 2와 같은 서열을 가지며 크기는 약 35 kDa이다. 그러나, 상기 단백질의 아미노산 서열에서도 역시 단백질의 기능에 영향을 미치지 않는 범위내에서 아미노산의

치환, 부가 또는 결실이 이루어질 수 있으며, 목적에 따라 단백질의 일부만이 사용될 수도 있다. 그러한 변형된 아미노산 서열 역시 본 발명의 범위에 포함된다. 따라서, 본 발명은 상기 발암 단백질과 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드 및 그의 단편을 역시 포함하며, 실질적으로 동일한 폴리펩티드란 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 가장 바람직하게는 95% 이상의 서열 상동성을 갖는 것들을 의미한다.

<28> 본 발명의 발암 유전자 및 단백질은 사람의 암 조직으로부터 분리하거나, 공지의 DNA 또는 펩타이드 합성 방법에 따라 합성할 수도 있다. 또한, 이렇게 제조된 유전자를 당 분야에 공지된 미생물 발현용 벡터에 삽입하여 발현 벡터를 제조한 후 이를 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 대장균 또는 효모 세포 등에 도입시킴으로써 상기 유전자의 DNA를 대량으로 복제하거나 단백질을 대량 생산할 수 있다. 벡터의 제작시에는, 상기 발암 유전자 또는 단백질을 생산하고자 하는 숙주 세포의 종류에 따라 프로모터, 터미네이터 등과 같은 발현 조절서열, 자가복제서열 및 분비 시그널 등을 적절히 선택하고 조합할 수 있다.

<29> 본 발명의 유전자는 노던 블롯(Northern blot) 등의 분석방법에서 정상 자궁경부조직과 정상 폐 조직에서는 발현이 거의 확인되지 않은 반면 자궁경부암 조직, 자궁암 세포주들 및 폐암 세포주들에서는 그 발현이 확인되므로 자궁암과 폐암을 유발시키는 강력한 발암유전자로 판단된다. 정상 섬유모세포(fibroblast)(NIH/3T3)에 이 유전자를 형질도입(transfection)시키면 정상 섬유모세포의 형태, 즉 섬유모세포가 기원하는 간엽조직(mesenchymal tissue)과는 전혀 크기와 모양이 다른 형태의 세포 모양을 나타낸다. 새로운 형태의 세포들을 광학 현미경과 전자현미경으로 분석하면 종양세포의 형태학적 소견을 확인할 수 있다.

- <30> 또한, 본 발명의 발암유전자를 형질도입시킨 정상 섬유모세포를 누드 마우스의 둔 위 부위에 접종시 약 28일이 경과하면서부터 종괴의 형성소견이 보이면서 약 40일이 경과시 1 cm X 1 cm 크기의 종양이 형성된다. 형성된 종괴는 헤마톡실린-에오신 염색시에 암종(carcinoma)이 확인되었으며, 전자현미경 및 면역조직화학 염색 (immunohistochemical staining)으로도 상피성 암종(epithelial carcinoma)이 확인된다.
- <31> 본 발명의 발암유전자는 자궁경부암과 폐암 조직들과 같은 상피성조직에서 발현되는 것으로 확인되어 위암, 유방암, 대장암 및 난소암과 같은 타암종들에서도 역시 발현이 증가될 것으로 예상되며, 다양한 암의 발생에 공통된 발암유전자일 것으로 추측된다.
- <32> 본 발명의 발암유전자는 자궁경부암과 폐암을 비롯한 암의 진단, 형질전환 동물의 제조 및 안티-센스(anti-sense) 유전자 치료 등에 효과적으로 이용될 수 있다.
- <33> 상기 발암유전자를 이용한 암의 진단 방법은, 예를 들어, 상기 발암유전자의 전부 또는 일부를 프로브로서 사용하여 대상자의 체액으로부터 분리한 핵산과 하이브리드화한 후 당 분야에 공지된 다양한 방법으로 이를 검출함으로써 대상자가 본 발명의 발암유전자를 가지고 있는지를 판단하는 과정을 포함한다. 상기 프로브를 방사선 동위원소 또는 효소 등으로 표지하면 용이하게 유전자의 존재를 확인할 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 상기 발암유전자의 전부 또는 일부를 포함하는 암 진단용 키트를 역시 제공한다.
- <34> 형질전환 동물은 본 발명의 발암유전자를 포유동물, 예를 들어, 래트 등의 설치류 동물에 도입함으로써 제조할 수 있으며, 이 유전자를 적어도 8세포기 이전의 수정란 단계에서 도입하는 것이 바람직하다. 이렇게 제조된 형질전환 동물은 발암성 물질 또는 항산화제와 같은 항암성 물질의 탐색 등에 유용하게 사용될 수 있다.

- <35> 안티-센스 유전자 치료에 있어서는, 예를 들어, 본 발명의 발암 유전자 또는 그의 일부와 상보적인 서열을 가지면서도 상기 유전자의 오픈 리딩 프레임(open reading frame; ORF)을 파괴할 수 있는 서열을 갖는 DNA 서열을 환자의 체내로 도입함으로써 상기 발암유전자의 발현으로 인한 암을 예방 또는 치료할 수 있다.
- <36> 한편, 본 발명의 발암유전자로부터 발현된 서열번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 그의 단편을 이용하여 당 분야에 공지된 통상의 방법에 따라 모노클로날 항체 또는 폴리클로날 항체를 제조할 수 있으며, 이러한 항체들을 이용하여 당분야에 공지된 효소 면역측정법(enzyme linked immunosorbent assay; ELISA), 방사선면역측정법(radioimmunoassay; RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 폴리아크릴 겔상의 웨스턴 블롯 또는 면역 블롯 등의 방법에 의해 대상자의 체액 시료중에 상기 단백질이 발현되었는지를 확인함으로써 암을 진단할 수 있다.
- <37> 또한, 본 발명의 발암유전자를 이용하여 지속적으로 증식할 수 있는 암 세포주를 확립할 수 있으며, 이러한 세포주는 예를 들어, 상기 발암 유전자가 형질도입된 섬유모세포를 이용하여 누드 마우스 등에 형성시킨 종양조직으로부터 제조할 수 있다. 이러한 암 세포주는 항암제 등의 탐색에 유용하게 이용될 수 있다.
- <38> 이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명하나, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.
- <39> 실시예 1: 종양세포 배양 및 총 RNA의 분리
- <40> (단계 1) 종양세포 배양

- <41> 정상자궁경부 조직, 동일한 환자로부터 추출한 종양조직과 전이 임파절 종양조직 및 원발성 자궁경부 종양조직들로부터 확립된 인간 자궁경부암 세포주인 CUMC-6(Kim, J. W. *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 62: 230-240(1996)) 세포주를 실험에 이용하였으며 종양 세포들은 2 mM 글루타민, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 100 IU/ml 페니실린 및 10% 우태아 혈청(Gibco, USA)이 함유된 웨이마우스(Waymouth's) MB 752/1 배양액에서 증식시켰다. 실험에 사용한 배양 세포들은 지수적 증식 도중의 세포들로서 트리판 블루(trypan blue) 염료로 염색할 때 95% 이상의 생존도를 보이는 세포를 이용하였다.
- <42> (단계 2) 자궁경부의 정상 및 종양 조직으로부터 총 RNA의 분리
- <43> 세포주로부터 RNA를 얻기 위해서 1×10^7 개의 자궁경부암 세포들이 들어있는 75-cm² 조직 배양 플라스크(Falcon, USA)를 트립신 처리하여 세포들을 수거하였으며, 정상조직의 경우 자궁근종 환자의 수술적 처치시 정상 자궁경부 조직을 채취하여 실험시작 시까지 -130°C 액화질소통에서 냉동 보관하였다. 또한, 종양조직의 경우 수술시 적출한 종양조직을 이용하였다.
- <44> 수거된 배양 세포 및 조직들로부터 RNeasy 총 RNA 키트(Qiagen Inc., CA, USA)를 사용하여 총 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA는 DNA를 제거하기 위하여 DNase I(Message clean kit, GenHunter)으로 소화시킨 후, 디에틸 피로카보네이트 수(DEPC-H₂O)로 50배 희석하고 분광 광도계(Beckman, USA)를 이용하여 파장 260 nm와 280 nm에서 흡광도를 측정하여 RNA 농도를 계산하였다. 정량된 RNA는 1-2 μ g씩 분주하여 -70°C에 보관하였으며 감별전개(differential display) 실험 직전에 DEPC-H₂O로 0.1 μ g/ μ l 농도가 되도록 희석하여 사용하였다.

<45> 실시예 2: 감별 전개 역전사 중합효소 연쇄반응(differential display reverse transcription-PCR)

<46> (단계 1) 총 RNA의 역전사(reverse transcription: RT) 반응

<47> 정상 자궁경부 조직과 암세포들로부터 추출된, 염색체 DNA로 오염되지 않은 2 ul의 총 RNA(0.1 ug/ul 농도)를 0.5 ml PCR 튜브에 넣고 2 uM 농도의 올리고-dT 프라이머 (Genhunter, Cor., MA, USA)를 각각의 튜브에 2 ul씩 분주하였다. 이후 9.4 ul DEPC-H₂O, 4.0 ul 5X RT-완충액, 1.6 ul d-NTPs(250 uM)가 포함된 15 ul의 반응 혼합물 (reaction mixture)을 첨가하여 전체양이 19 ul가 되도록하고 PCR 기계(Perkin Elmer 480)를 이용하여 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction: PCR)을 실시하였다. 반응의 조건은 65°C에서 5 분 반응 후 37°C에서 60분간 역전사시키는데 이 과정에서 10분이 지난 다음 반응을 정지시키고 1 ul의 MMLV(moloney murine leukemia virus) 역전사 효소를 각각의 튜브에 섞었다. 이후 75°C에서 5 분간 반응시킨 후 4°C에서 반응을 정지시켰다.

<48> (단계 2) PCR

<49> 역전사 반응액 2 ul를 각각의 튜브에 분주하고 2 ul의 무작위 프라이머(Genhunter, Cor., MA, USA)를 첨가하였다. 이후 9.2 ul DEPC-H₂O, 2.0 ul 10X PCR-완충액, 1.6 ul d-NTPs(25 uM), 2.0 ul 올리고-dT 프라이머, 1.0 ul α -[³⁵S]dATP(1200 Ci/mmol), 0.2 ul *AmpliTaq*(Perkin-Elmer)가 포함된 16 ul의 반응 혼합물을 첨가하여 전체양이 20 ul가 되도록하고 PCR 기계(Perkin Elmer 480)를 이용하여 PCR을 실시하며 반응전 25 ul의 미

네랄 오일(mineral oil)을 첨가하였다.

<50> 반응의 조건은 95°C에서 40초 반응 후 40°C에서 2분, 72°C에서 40초를 40회 반응시키며 최종 연장(final extension)을 위하여 72°C에서 5 분간 더 반응시킨 후 4°C에서 반응을 정지시켰다.

<51> (단계 3) 6% 변성 폴리아크릴아미드 겔 전기영동

<52> 10X TBE 완충액(Trizma 염기 108 g, 붕산 55 g, EDTA 3.7 g)을 이용하여 100 ml(우레아 50 g, 30% 폴리아크릴아미드 20 ml, TDW 20 ml, 5X TBE 20 ml, 10% 과황산 암모늄 1 ml, TEMED 15 ul)의 겔을 제조하여 전기영동에 이용하며 최소 두 시간동안 중합반응(polymerization)이 일어나도록 실온에 방치하고 실험 직전에 45°C에서 예비 실행(pre-running)시켰다. 3.5 ul의 PCR 반응산물에 2 ul의 로딩 염료(loading dye)(95% 포름아미드, 10 mM EDTA pH 8.0, 0.09% 자일렌 시아놀(xylene cyanole) FF, 0.09% 브로모페놀 블루)를 섞고 80°C에서 2분간 반응시킨 후 겔에 로딩하여 전기영동시켰다. 전기영동은 60 W로 6시간 진행시키며 자일렌 색소가 바닥에 도달할 때 전압을 끄고 3 MM 페이퍼(paper)에 겔을 블롯팅시키기 위하여 플라스틱 랩으로 겔을 싸 후 진공 겔 건조기(vacuum gel dryer)에서 80°C로 2시간동안 건조시켰다.

<53> (단계 4) cDNA 프로브의 재증폭

<54> 72시간동안 X-레이 필름에서 현상 후 서로 다른 발현 정도를 보이는 밴드의 위치를 확인하고 찾고자하는 약 200 염기쌍(bp) 크기 이상의 밴드를 칼로 도려내어 이조각을 100 ul 증류수에 10분간 담근 후 15분간 가열하고 원심분리하여 상청액만 새로운 마이크로튜브에 옮겼다. 이후 10 ul의 3 M 아세트산 나트륨, 5 ul의 글리코젠, 및 450 ul의

100% 에탄올을 첨가하고 -80°C 동결기(freezer)에서 30분간 방치시킨 후 DNA 펠렛(pellet)을 얻기 위하여 4°C에서 10분간 원심분리시켰다. 원심분리 후 상청액을 제거하고 200 µl의 빙냉 85% 에탄올로 DNA 펠렛을 세척한 후 에탄올을 제거하였다. 여기에 10 µl의 증류수를 가하여 DNA를 녹이고 4 µl를 재증폭 반응에 이용하였다.

<55> PCR 재증폭을 위하여 반응혼합물(물 20.4 µl, 10X PCR 완충액 4.0 µl, 250 µM dNTPs 3.2 µl, 2 µM H-AP 프라이머(RNA image kit, GenHunter) 4.0 µl, 2 µM H-T11M 프라이머 (RNA image kit, GenHunter) 4.0 µl, cDNA 4.0 µl, *AmpliTaq* 0.4 µl)을 40 µl로 조절하였으며, PCR 반응조건은 95°C에서 40초 반응 후 40°C에서 2분, 72°C에서 40초를 40회 반응시키며 최종 연장으로 72°C에서 5 분간 더 반응시킨 후 4°C에서 반응을 정지시켰다. 반응이 완료된 PCR 산물 5 µl에 타입 I 로딩 완충액(Sigma) 1 µl를 섞어서 에티디움 브로마이드(EtBr) 염색이 된 1.5% 아가로스 겔상에서 전기영동하여 재증폭 여부를 확인하며 DNA 서열분석 겔상에서 크기를 비교하였다. 이때 123 bp 크기표지를 이용하여 밴드의 크기를 결정하였다.

<56> 실시예 3: 클로닝

<57> T7 프로모터와 SP6 프로모터를 둘 다 가지고 있으며 클로닝시 삽입체의 삽입 방향에 상관없이 세포의 전사를 시행하여 리보프로브(riboprobe)를 쉽게 만들 수 있으며, 플라스미드 DNA의 제한효소 처리가 용이한 pGEM-T 이지(easy) 벡터(Promega, USA)를 선택하여 실험에 이용하였다.

<58> (단계 1) 연결

<59> 연결 반응을 위하여 0.5 ml 튜브에 실시예 2에서 얻은 PCR 산물 2 ul, pGEM-T 이질 벡터(50 ng) 1 ul, T4 DNA 연결효소 10X 완충액 1 ul, T4 DNA 연결효소(3 weiss units/ul; T4 DNA ligase, Promega) 1 ul를 가한 후 최종 반응액이 10 ul가 되도록 증류수를 가하여 피펫팅으로 잘 섞은 후 4℃에서 배양하였다.

<60> (단계 2) 콤펜트(competent) 세포의 제조

<61> 10 ml의 LB 브로쓰(박토-트립톤 10 g, 박토-효모 추출물 5 g, NaCl 5 g)에 대장균 JM109를 배양하여 OD 600값이 약 0.3 - 0.6이 되도록 한 후 얼음에 약 10분간 방치하였다. 이후 4℃에서 10 분간 4000 rpm으로 원심분리하여 상청액을 버리고 세포를 수집하였다. 수집한 세포 펠릿을 10 ml의 빙냉 0.1 M CaCl₂에 30분~1시간가량 노출시켜 세포의 형질전환(transformation)을 유도하였다. 다시 4℃에서 10 분간 4000 rpm으로 원심분리하여 상청액을 버리고 세포를 모아서 2 ml의 빙냉 0.1 M CaCl₂에 섞은 후 콤펜트 세포 현탁액 200 ul를 새로운 마이크로퓨즈(microfuge) 튜브에 옮기고, 여기에 2 ul의 연결 반응 산물을 첨가하여 42℃에서 90초간 수욕(water bath)에서 배양시켰다. 배양이 끝난 후 빙욕(ice bath)에 바로 옮겨서 1-2분간 세포를 차갑게한 후 800 ul의 SOC 배지(박토-트립톤 2.0 g, 박토-효모 추출물 0.5 g, 1 M NaCl 1 ml, 1 M KCl 0.25 ml, TDW 97 ml, 2M Mg²⁺ 1 ml, 2 M 글루코스 1 ml)을 첨가하여 45분간 37℃에서 220 rpm으로 진탕 수욕에서 배양시켰다.

<62> 37℃ 배양기에 미리 넣어둔 앰피실린이 첨가된 LB 플레이트에 X-gal 20 ul를 담고 유리봉으로 확산시킨 후 여기에 200 ul의 형질전환된 세포를 넣어서 다시 유리봉으로 확산시키고 37℃에서 12시간 배양하였다. 배양 후 형성된 백색 콜로니를 3-4개 선택하여 앰피실린이 첨가된 LB 플레이트에 각각의 선택된 클론들을 심었다. 플라스미드를 제조하

기 위하여 이들 중 삽입이 확인된 콜로니만 10 ml의 테리픽 브로쓰(terrific broth; TDW 900 ml, 박토-트립톤 12 g, 박토-효모 추출물 24 g, 글리세롤 4 ml, 0.17 M KH_2PO_4 , 0.72 M K_2HPO_4 100 ml)에 각각의 선택된 콜로니를 배양하였다.

<63> 상기에서 선택된 형질전환된 대장균 JM109/HCCR1은 1999년 10월 11일자로 생명공학 연구소 유전자은행에 기탁번호 제 KCTC 0667BP 호로서 기탁되었다.

<64> 실시예 4: 재조합 플라스미드 DNA의 분리

<65> 삽입이 확인된 콜로니로부터 위자드 플러스 미니프렙스 DNA 정제 키트(Wizard™ Plus Minipreps DNA Purification Kit; Promega, USA)를 사용해서 다음과 같이 플라스미드 DNA를 분리하였다. 10 ml의 테리픽 브로쓰에 증균시킨 형질전환된 대장균 JM109를 10,000 X g 에서 5분간 원심분리한 후 가능한한 대부분의 상청액을 버리고 여기에 세포 재현탁 용액 250 ul를 가하여 세포 펠릿이 완전히 현탁되도록 볼텍스(vortex)로 혼합시켰으며, 여기에 용균 용액(cell lysis solution) 250 ul를 가하여 혼합시켰다. 이후 10 ul의 알칼라인 프로테아제(alkaline protease) 용액을 넣고 실온에서 5분간 배양시킨 후 350 ul의 중화 용액을 넣고 혼합하였다. 형성된 박테리아 용균액을 14,000 X g에서 10 분간 실온에서 원심분리시킨 후 맑아진 용균액을 스핀 칼럼(spin column)으로 옮겨서 14,000 X g에서 1분간 실온에서 원심분리시켜 통과된 용출액을 버렸다. 95% 에탄올로 희석시켜놓은 750 ul의 칼럼 세척액(column wash solution)을 스핀 컬럼에 넣고 14,000 X g에서 1분간 실온에서 원심분리시켜서 통과된 용출액을 다시 버리고 95% 에탄올로 희석시켜놓은 250 ul의 칼럼 용출액을 스핀 컬럼에 넣고 14,000 X g에서 2분간 실온에서 원

심분리시켜서 통과된 용출액을 버렸다. 이후 스핀 컬럼을 1.5 ml 멸균 튜브에 옮겨서 100 ul의 뉴클레아제 무함유수를 스핀 컬럼에 넣어서 14,000 X g에서 1분간 실온에서 원심분리시켜서 통과된 플라스미드 DNA를 수득한다. 제조된 100 ul의 플라스미드 DNA중 5 ul를 분리하여 여기에 *EcoRI* 효소(Boehringer Mannheim, USA) 0.5 ul, 10X *EcoRI* 완충액 1 ul, TDW 3.5 ul를 첨가하여 효소 절단을 실시한 후 2% 겔에서 전기영동을 하여 실험과정을 확인하였다.

<66> 실시예 5: DNA 염기서열 분석

<67> (단계 1) PCR 산물의 전처리

<68> 실시예 2의 (단계 2)에서 얻은 PCR 산물 5 ul에 엑소뉴클레아제 I (10 단위/ul) 1 ul, 새우 알칼라인 포스파타제(2 단위/ul) 1 ul를 넣은 후 잘 섞어서 PCR 기계에서 37℃에서 15분간 배양시킨후 시퀀나제 PCR 산물 서열분석 키트(Sequenase PCR Product Sequencing kit; Amersham, USA)를 이용하여 직접 서열분석을 시작하였다.

<69> (단계 2) 어닐링 반응

<70> 전처리가 끝난 PCR 산물 2 ul에 물 7 ul, 및 프라이머로서 T7 또는 SP6 프라이머(5 ~10 pmol/ul) 1 ul를 넣고 이 용액을 잘 섞어서 PCR 기계에서 100℃에서 2분 30초간 반응시킨 후 즉시 빙냉욕에서 5분간 식히고 원심분리시킨 후 얼음으로 냉각시켰다.

<71> (단계 3) 종결 혼합물 준비

<72> 4개의 표시된 튜브(A, T, G, C)를 준비하고, ddGTP 종결 혼합물(termination mix), ddATP 종결 혼합물, ddTTP 종결 혼합물, ddCTP 종결 혼합물(Amersham, USA)을 꺼내어 이후 예비 가온(pre-warm) 단계와 종결 반응 단계를 위하여 실온에서 방치시켰다. 이후 4

개의 표시된 튜브(G, A, T, C)에 종결 혼합물을 넣는데, G가 표시된 튜브에는 ddGTP 종결 혼합물을 2.5 ul, A가 표시된 튜브에는 ddATP 종결 혼합물을 2.5 ul, T가 표시된 튜브에는 ddTTP 종결 혼합물을 2.5 ul, 그리고 C가 표시된 튜브에는 ddCTP 종결 혼합물을 2.5 ul씩 각각 가하고 증발을 막기 위하여 뚜껑을 닫고 4개의 종결 튜브(G, A, T, C)들을 최소한 1분간 37℃ 반응기에서 방치하였다.

<73> (단계 4) 표지화 반응

<74> (단계 2)에서 준비한 병냉의 어닐링된 DNA 혼합물 10 ul에 반응 완충액 (USB) 2 ul, 0.1 M DTT 1 ul, 및 5X 표지화 혼합물을 물로 5배 희석하여 제조한 표지화 혼합물 (labelling mix) 2 ul, [³⁵S] dATP(Amersham, USA) 0.5 ul (5 uCi), 및 시퀀나제 DNA 중합효소 2 ul를 가하여 잘 섞은 후 실온에서 5분간 방치하였다.

<75> (단계 5) 종결 반응

<76> (단계 4)의 표지화 반응 용액 3.5 ul씩을 (단계 3)의 종결 혼합물 2 ul가 담겨진 각각의 종결 튜브(G, A, T, C)에 옮겨서 잘 섞고 37℃ 수욕으로 옮겨서 5~10분간 방치한 후 반응 정지 용액(USB) 4 ul를 가하여 반응을 정지시켰다. 서열 분석 겔에 로딩하기 바로 직전에 75℃에서 2분간 처리하고 즉시 각 열(lane)에 2-3 ul 씩 로딩하였다.

<77> 본 실시예에 의해 확인된 발암유전자의 염기서열은 서열번호: 1에 나타낸 바와 같았고, 이는 서열번호: 2를 갖는 약 35 kDa의 단백질을 코딩한다.

<78> 실시예 6: 정상 및 종양조직, 전이조직 및 타암종 세포주들에서 신규 암유전자의 발현 여부 탐색

- <79> 정상자궁경부 조직, 자궁경부암 조직, 및 인간 자궁경부암 세포주인 CaSki(ATCC CRL 1550) 및 CUMC-6로부터 실시예 1의 방법으로 총 RNA를 분리하였다. 또한, 정상 폐 조직과 폐암세포주들에서 HCCR1 유전자의 발현 양상을 비교하기 위하여 정상 폐조직과 H358, H460, H441, H1299, H520, H2009 및 H157 폐암세포주(한국세포주 연구재단)들에서도 총 RNA를 분리하였다. 분리된 총 RNA 각 20 ug씩을 1% 포름알데히드 아가로즈 겔에서 전기영동한 후 나일론 막으로 옮겼다(Kim, J. W. *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 71: 266-269(1998)).
- <80> mRNA에 대한 특이적 프로브는 디곡시게닌(digoxigenin)-11-dUTP (Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 중합효소 연쇄반응에 의하여 제조한 후 ³²P로 표지하였다. 또한, 동일한 용량의 RNA가 사용되었는지를 확인하기 위해서 사람의 전장 β -액틴(actin) cDNA 프로브를 내부 표준물질로 사용하며 교잡 반응 후 나일론 막을 화학발광 검출 방식으로 반응시킨 다음 X-Ray 필름(AGFA)에 5분 및 10분간 현상시키고, 마지막으로 결과의 재현성을 점검하기 위하여 노던 분석을 재실시하여 결과를 재확인하였다.
- <81> 조직과 세포주들에서 HCCR1 유전자 발현 양상을 관찰한 결과 정상 자궁경부조직들에서는 발현이 거의 되지 않고 자궁경부암 조직 및 자궁경부암 세포주(CaSki와 CUMC-6 세포주들)에서는 현저한 약 2.2kb 크기의 유전자 발현이 관찰되었다(도 1). 도 1에서, Normal열은 정상 자궁 경부 조직을, Cancer열은 자궁 경부암 조직을, 그리고 CaSki열 및 CUMC-6열은 자궁암 세포주를 각각 나타낸다.
- <82> 또한, 정상 폐조직과 폐암세포주들에서 HCCR1 유전자의 발현 양상을 비교한 결과 정상 폐조직에서는 발현이 되지않은 반면에 7종류의 폐암 세포주들(H358, H460, H441, H1299, H520, H2009 및 H157)에서는 HCCR1 유전자의 증가된 발현이 확인되었다(도 2).

- <83> 실시예 7: 암유전자의 전체 염기서열 분석을 위한 cDNA 라이브러리 제작 및 전체 염기서열 분석
- <84> 암관련 유전자로서의 기능이 확인된 유전자의 전체 염기서열을 분석하기 위하여 암 조직들을 이용하여 다음과 같이 cDNA 라이브러리를 제작하였다(Okayama, H. and Berg, P., *Mol. Cell Biol.*, 2: 161-170(1982)).
- <85> cDNA 라이브러리를 제작하기 위하여 캡파인더 PCR cDNA 라이브러리 구성 키트 (Clontech)의 원리를 이용하였으며(Capfinder PCR cDNA synthesis kit(January 1996) *CLONTECHniques*, XI(1): 2-4(1996)), 정상자궁경부 조직과 CUMC-6 자궁 경부암세포주로부터 총 RNA 1 ug씩을 각각 추출한 후 역전사시켜서 첫번째 가닥 상보적 DNA(first-strand complementary DNA(cDNA))를 합성한 후 이를 다시 롱 디스턴스(LD, Clontech) PCR을 실시하여 증폭시켰다. 이후 PCR 산물에 어댑터(Clontech)를 부착시킨 후 T4 폴리뉴클레오티드 카이네이즈 30 단위(Clontech)를 이용하여 인산화시키고, λ 파지 벡터(Clontech)에 연결시킨 후 Y1090 대장균(Clontech)에 형질전환시켰으며 cDNA를 벡터에 연결하기 위하여 람다 DNA 패키징 시스템(Promega)을 이용하였다.
- <86> 이렇게하여 제작된 라이브러리를 이용하여 실시예 5에서 염기서열이 확인된 HCCR1 유전자의 DNA 부분 염기서열(염기번호 1810-2057(248 bp))을 가진 클론을 프로브(probe)로하여 라이브러리 탐색 작업을 서던 블롯 방식(Sambrook, J., et al., *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)으로 실시하여 양성반응을 보이는 클론을 선택하여 이로부터 파지 DNA 및 플라스미드 DNA를 분리한 후 실시예 5에서와 같은 방법으로 전체 염기서열을 분석(full cDNA sequencing)하였

다.

<87> 정상 자궁경부 조직, 자궁경부암 유래 세포주(CUMC-6), 자궁경부 종양조직 및 자궁경부종양에서 전이된 임파절 조직들을 대상으로 mRNA 감별 전개 기법을 적용한 결과 정상 조직에서는 발현이 되지 않고 종양 세포주, 종양조직 및 전이 종양조직들에서는 확연히 나타나는, 발암유전자(oncogene)의 역할을 하는 것으로 추정되는 250 bp 크기의 부분 염기서열을 지닌 cDNA 클론을 분리해내었다.

<88> 이후 cDNA 라이브러리 검색작업을 실시한 결과 2,118 bp 크기의 전체 염기서열을 가진 전체 클론을 확보하게 되었으며 이 유전자는 기존의 밝혀진 유전자서열과 전혀 상동성이 없는 신규 유전자로서 HCCR1 유전자로 명명하였다. 신규 발암 유전자인 HCCR1의 전체염기서열은 서열번호: 1로서 기술한 바와 같다. 이 염기서열을 분석한 결과 앞부분에서 시그널 펩타이드(signaling peptide)를 코드하는 부위(뉴클레오티드 번호 9-83)가 확인되었으며 중간부분에서 하나의 막통과 도메인(single transmembrane domain)(뉴클레오티드 번호 435-494)이 확인되었다.

<89> 실시예 8: 암유전자 HCCR1을 형질도입시킨 정상 섬유모세포의 변화

<90> (단계 1) 암유전자 HCCR1을 발현하는 벡터의 제조 및 형질도입

<91> 실시예 4에서 분리된 암유전자 HCCR1의 플라스미드 DNA를 *Sa*/I(Takara) 효소로 처리한 후 T4 DNA 연결효소를 사용하여 pCDNA3 발현 벡터(Promega)의 클로닝 부위(multiple cloning site)에 연결시켜 벡터를 제조하였다.

<92> 제조된 벡터들을 대장균 JM109에 형질전환시킨 후 앰피실린(50 μ g/ml)이 함유된 LB

플레이트에 접종하고 37℃ 배양기에서 18 시간 배양하였다. LB 플레이트에서 생성된 콜로니들로부터 암관련 유전자를 발현하는 콜로니를 분리하고, 분리한 콜로니들을 배양하여 플라스미드 DNA를 분리하여 삽입된 DNA를 확인하고 형질전환된 대장균으로부터 다량의 재조합 플라스미드를 분리하였다. 제조된 유전자를 삽입한 벡터와 유전자가 삽입되지 않은 pCDNA3 벡터들을 각각 리포펙타민(lipofectamine, Boehringer-Mannheim)을 사용하여 NIH/3T3 정상 섬유모세포(ATCC CRL 1658)내로 형질도입시키고 48 시간 동안 배양한 후 10 % 우태아 혈청이 함유된 배지로 갈아준 뒤 24 시간 동안 더 배양하였다. 배양된 암세포를 DMEM (Sigma) 배양액으로 1:10으로 희석하여 배양 플라스크에 접종한 후 0.6 mg/ml의 네오마이신 및 10 % 우태아혈청을 함유하는 DMEM배지(Gibco) 에서 2-3 주 동안 배양하였다.

<93> (단계 2) 암유전자를 형질도입시킨 NIH/3T3 섬유모세포들의 세포 생물학적 연구

<94> (1) 발암유전자가 도입된 NIH/3T3 정상 섬유모세포의 성장특성

<95> 암유전자 HCCR1을 형질도입시킨 NIH/3T3 정상 섬유모세포, 아무런 처치를 하지 않은 야생형 NIH/3T3, 및 pCDNA3 벡터만 형질도입시킨 NIH/3T3 세포주들 사이에서 세포 성장속도를 비교하였다.

<96> HCCR1 발암유전자를 형질도입시킨 NIH/3T3 정상 섬유모세포의 성장특성을 파악하고자 성장 곡선과 군체수 2배 증식 시간(population doubling time) 및 콜로니 형성능(colony-forming efficiency) 등을 측정하며, 성장 곡선은 1×10^5 개의 세포를 25-cm^2 조직 배양 플라스크(Falcon, USA)에서 13일간 배양시켜 산정하였다. 군체수 2배 증식 시간은 성장 곡선으로부터 구하였으며, 콜로니 형성능은 10^4 개의 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포를 1 ml의 0.3 % 아가를 포함한 10 % 우태아 혈청이 함유된 웨이

마우스 배지에 부유시킨 후 0.6 % 아가로 피복된 33 mm 플레이트에 접종하여 14-21 일 동안에 형성된 콜로니(클러스터(cluster) 당 100 개 이상의 세포)의 수를 계수한 후 다음의 수학적 식 1에 의해 계산하였다.

<97> 【수학적 식 1】

$$\text{콜로니 형성능(\%)} = \left[\frac{\text{육안으로 확인된 콜로니의 수}}{\text{접종된 세포의 수}} \right] \times 100$$

<98> HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포의 성장특성을 분석한 결과 균체수 2배 증식 시간은 약 42 시간이었으며, 콜로니 형성능(plating efficiency)은 약 32 %로 나타났다. 야생형 NIH/3T3 및 pCDNA3 벡터만 형질도입시킨 NIH/3T3 세포주들의 2배 증식시간은 각각 약 120, 110 시간으로 나타났다(Jainchill, J. L., et al., *J. Virol.*, 4: 549-553(1969)).

<99> (2) 추출된 종양조직 및 배양세포의 형태학적 관찰

<100> (1)에서와 같이 배양된, HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포를 위상차 현미경으로 관찰한 결과, 시험관내에서 단층으로 배양된 세포들은 상호간에 접촉에 의한 억제현상이 없이 포장도로 같은 배열(pavement-like arrangement) 및 다형성, 다각성 형태를 갖는 상피성 형태를 나타내었다(도 3 참조).

<101> 상기 배양 세포들을 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin, H & E) 염색을 한 후 관찰한 결과, 중등도의 핵의 다형성, 뚜렷한 핵소체, 및 과립상 염색질 소견 및 종양 거대세포들을 보여주었고, 비정형 유사분열이 관찰되었다(도 4 참조).

<102> 또한, 상기 표본들을 이용하여 투과 전자현미경 표본제작을 하였는데 그 방법은 Ca^{2+} , Mg^{2+} 등이 포함되지 않은 PBS로 표본을 세척한 후 2.5% 글루타르알데히드가 함유된

카코딜레이트(cacodylate) 완충용액으로 4℃에서 2시간동안 고정시키며, 이후 카코딜레이트 완충용액(pH 7.4)으로 세척하고 2% 오스뮴 테트라옥사이드(osmium tetroxide)로 2시간 동안 후고정시킨 후 20% 에탄올로 탈수시켜 Epon 812(Sigma)에 포매(embedding)시켰다. 중합반응(polymerization) 후 초미세절편(ultrathin section)을 만들어 우라닐 아세테이트(uranyl acetate)와 시트르산 납(lead citrate)으로 이중염색한 후 투과 전자현미경(1200 EX, JEOL, Japan)으로 관찰하였다.

<103> 투과 전자현미경 소견상 핵은 다형성(pleomorphism)을 나타내었으며 3개의 핵소체(nucleoli)도 뚜렷하였다. 핵막은 함입(invagination)이 심하였으며 염색질은 핵막 주위에 집중적으로 분포되었다. 세포표면에는 불규칙한 크기의 돌기가 보이면서 (도 5a 참조), 세포질에는 미토콘드리아(mitochondria), 조면 세포질내 소망(rough surfaced endoplasmic reticulum: rER), 빈 소포(empty vesicle) 및 유리 리보솜(free ribosome) 등과 같은 소기관들이 잘 발달되어 있었다(도 5b).

<104> 실시예 9: 동물에서 HCCR1 발암유전자의 종양 형성능 및 전이 유무 조사

<105> 생후 4-5 주된 3 마리의 누드마우스(athymic nu/nu on BALB/c background; 대덕 화학연구소)를 대상으로 트리판 블루 염료 배제(trypan blue dye exclusion) 검사상 생존도가 95% 이상인 1×10^7 개의 발암유전자를 형질감염시킨 NIH/3T3 세포를 200 μ l의 PBS에 섞어 둔위 부위의 피하에 주입한 뒤 종양형성 및 전이유무를 조사하고, 그 결과를 야생형 NIH/3T3 세포만을 투여한 누드마우스와 pCDNA3 벡터만을 형질도입시킨 누드 마우스들의 것과 비교하였다.

- <106> HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포의 종양형성능을 조사한 결과 피하에 이식한 경우 4주 경에 이식부위에 종양의 형성이 확인되기 시작하였으며, 6주경에는 약 1 cm X 1 cm 크기의 종괴를 형성하면서 종괴 주위에 또 다른 종양을 형성하기 시작하였다(도 6 참조).
- <107> 누드마우스에서 형성된 종괴로부터 조직을 채취하여 실시예 8의 (단계 2)의 (2)와 같이 헤마톡실린-에오신 염색을 행한 후 관찰한 결과, 형태학적 소견은 크고 뚜렷한 핵의 다형성과 수포성 핵 및 뚜렷한 핵소체들을 보였으며 작은 크기의 종양 소(tumor nest)들 사이에는 적은 양의 간질조직들이 관찰되었으며 또한 증가된 감수분열을 보여주었다(도 7 참조).
- <108> 실시예 10: HCCR1 발암유전자가 형질도입된 NIH/3T3 섬유모세포를 이용하여 누드마우스에서 형성시킨 종양조직의 전자현미경적 소견과 이로부터 새로운 암 세포주의 확립 및 성장특성
- <109> 누드마우스에서 형성된 종양조직을 적출하여 그 일부를 실시예 8의 (단계 2)의 (2)와 같이 전자현미경 표본을 만들어 관찰한 결과 상피성 암의 특성인 데스모솜(결합반, desmosome)이 뚜렷이 관찰되었다(도 8). 또한 채취한 조직의 일부를 소독된 60 x 15 mm 조직 배양 접시(Falcon, USA)에서 가능한 많은 양의 섬유조직을 절제해낸 후 인산염 완충용액(phosphate buffered saline; PBS)으로 3회 이상 세척하였다. 이후 2 mM 글루타민, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 100 IU/ml 페니실린 및 20 % 우태아 혈청(Gibco, USA)이 함유된 DMEM 배양액(Gibco, USA)에서 미세가위를 이용하여 2 내지 3 mm 크기의 절편이 되도록 종양조직을 분쇄하여 세포부유액을 만들었다. 이러한 기계적 처리후 생성

된 세포부유액들은 배양액으로 3회 이상 세척후 60 x 15 mm 조직 배양 접시(Falcon, USA)에 옮겨서 37°C, 5% CO₂가 포함된 세포 배양기에서 배양시켰다. 초기배양 및 계대시에는 20% 우태아 혈청을 이용하였다.

<110> 시험관내에서의 세포성장은 배양시작 후 약 2일간의 정체를 지난 후 명확히 나타났으며 세포가 성장하여 시험관내에서 조밀하게 됨에따라 접촉에 의한 억제현상(contact inhibition)은 없었으며 세포들은 서로 중첩되어 성장하였다. 배양세포의 성장은 왕성하였으며 단층세포의 양상을 보이면서 확산하였다(도 9 참조).

<111> 실시예 11: HCCR1 발암유전자로부터 발현되는 단백질의 크기 결정

<112> HCCR1 발암 유전자를 대장균 BL21(ATCC 47092)에 형질도입시켜서 이를 LB 브로쓰에서 진탕 배양한 후 다시 이를 1/100로 희석시킨 대장균을 다시 3시간동안 배양하였다. 여기에 10 mM의 이소프로필 베타-D-티오칼락토-피라노사이드(IPTG, Sigma)를 첨가하여 단백질 생산을 유도한 후 12% SDS 겔에서 전기영동한 결과 IPTG로 단백을 유도한 균에서는 확실하게 증가된 단백질 생성이 약 35 kDa 부위에서 확인되었다 (도 10).

【발명의 효과】

<113> 본 발명의 발암유전자는 기존의 보고된 발암유전자와는 전혀 상동성을 나타내지 않는 신규 유전자로서 자궁경부암과 폐암을 비롯한 암의 진단, 형질전환 동물의 제조 및 안티-센스(anti-sense) 유전자치료 등에 효과적으로 이용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호: 1의 염기서열을 갖는 발암 유전자 또는 그의 단편.

【청구항 2】

제1항의 유전자에 의해 코드되는 서열 번호: 2의 아미노산 서열을 갖는 단백질 또는 그의 단편.

【청구항 3】

제1항의 발암 유전자 또는 그의 단편을 포함하는 벡터.

【청구항 4】

제3항의 벡터에 의해 형질전환된 미생물.

【청구항 5】

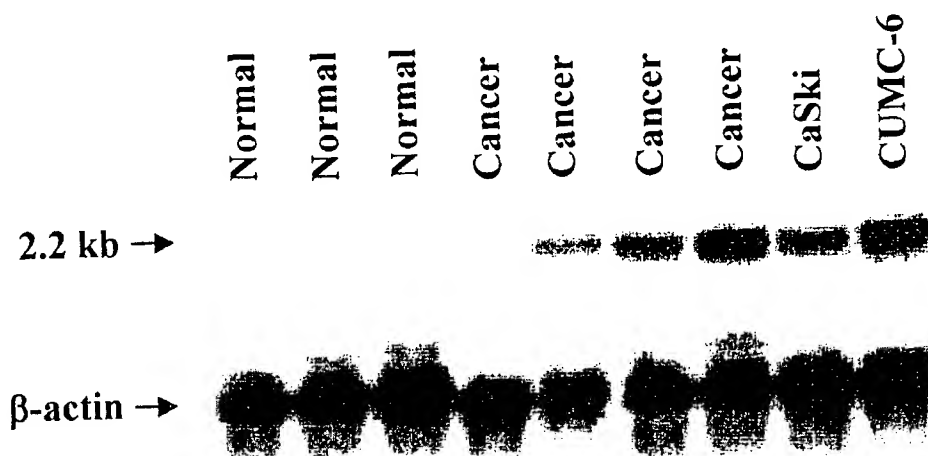
제4항에 있어서, 대장균 JM109/HCCR1(기탁번호: KCTC 0667BP)인 미생물.

【청구항 6】

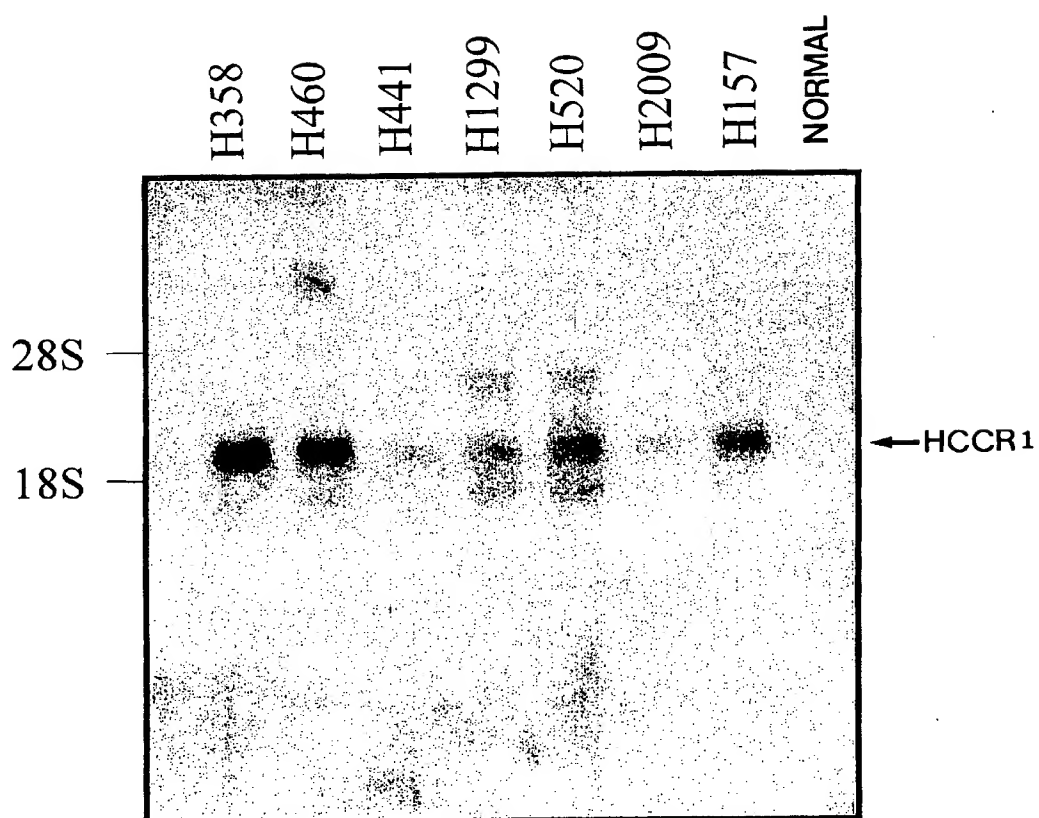
제4항 또는 제5항의 미생물을 이용하여 제2항의 단백질 또는 그의 단편을 제조하는 방법.

【도면】

【도 1】



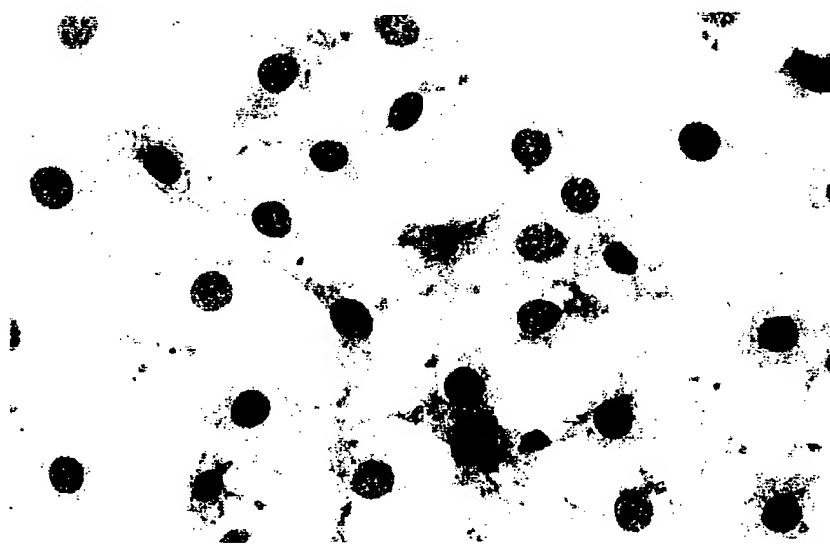
【도 2】



【도 3】



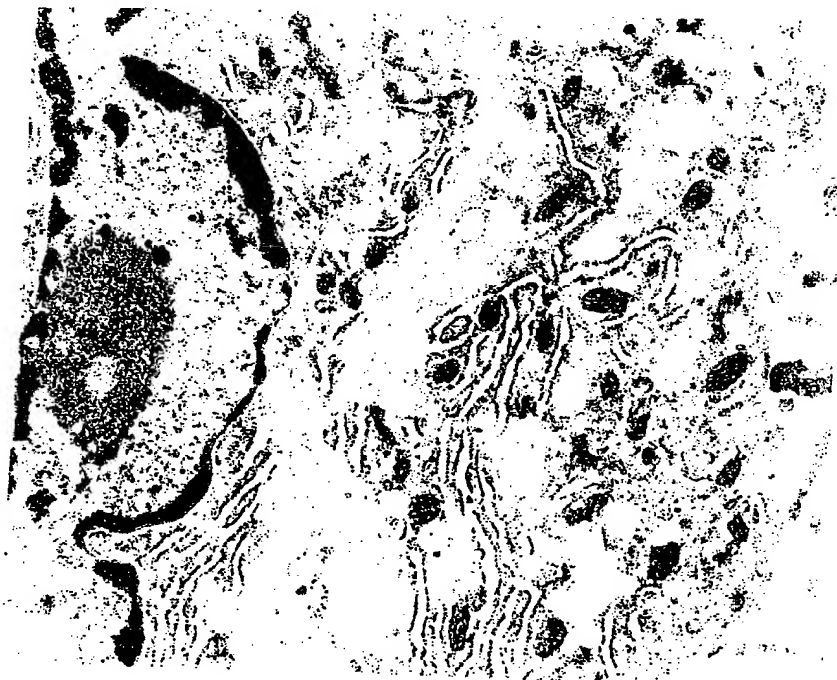
【도 4】



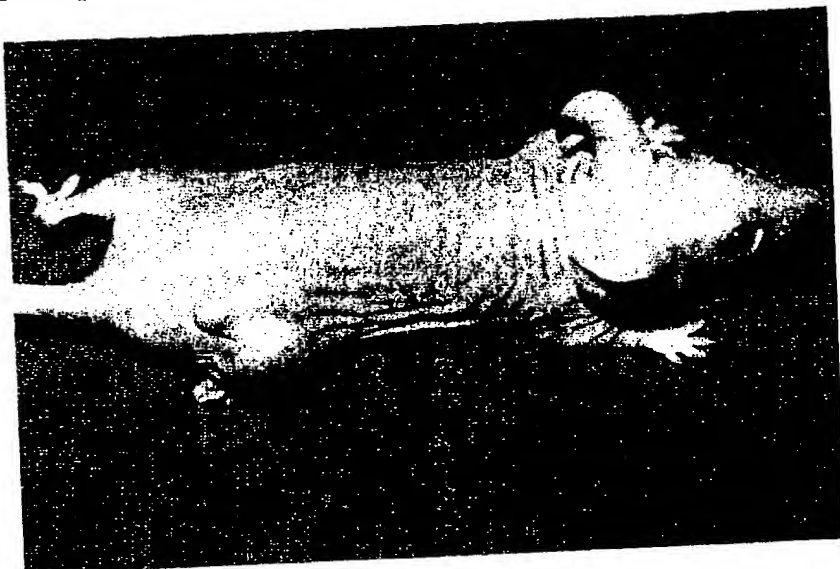
【도 5a】



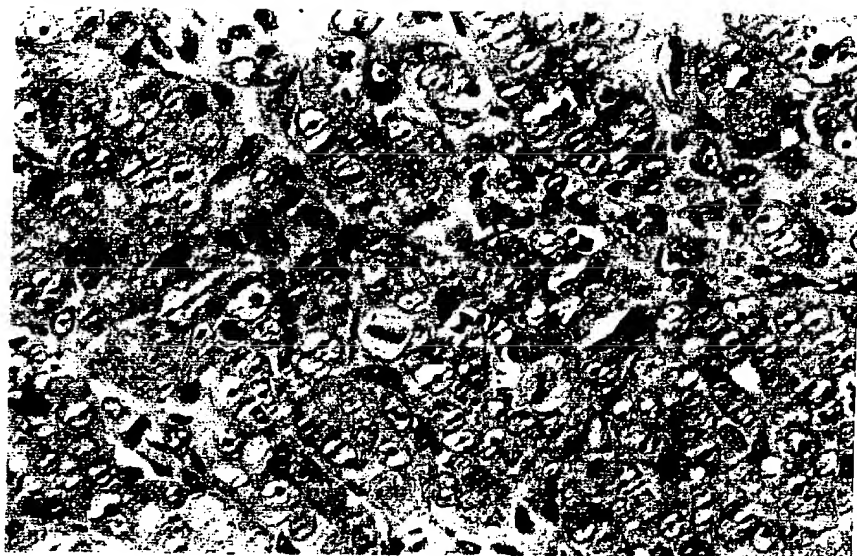
【도 5b】



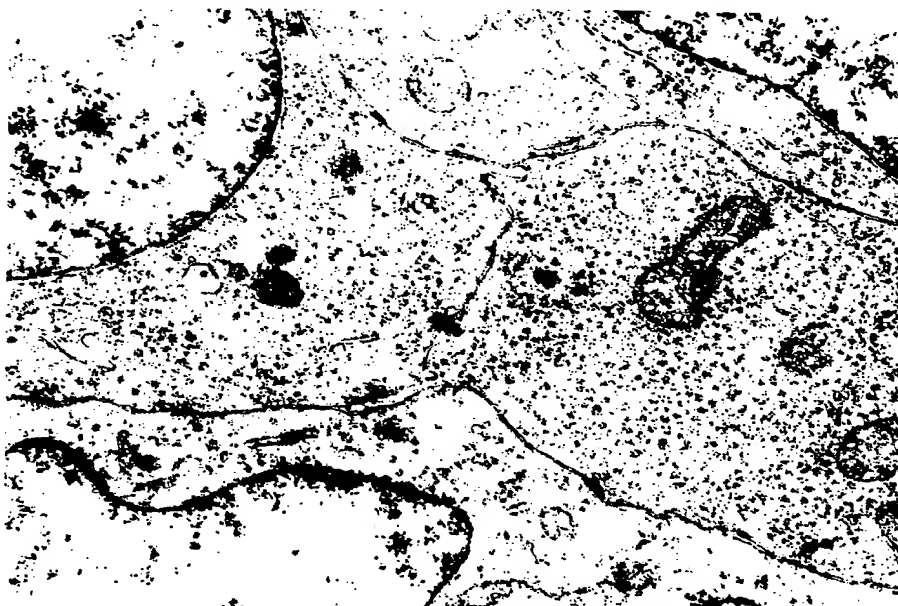
【도 6】



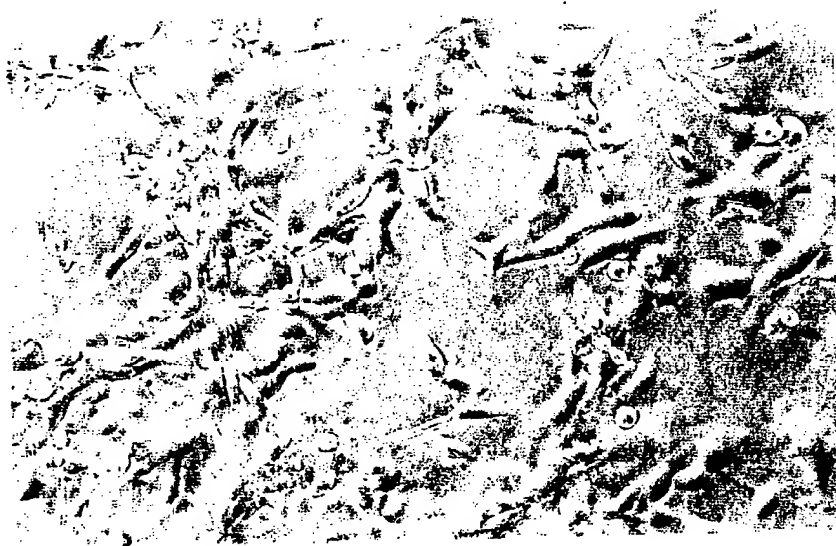
【도 7】



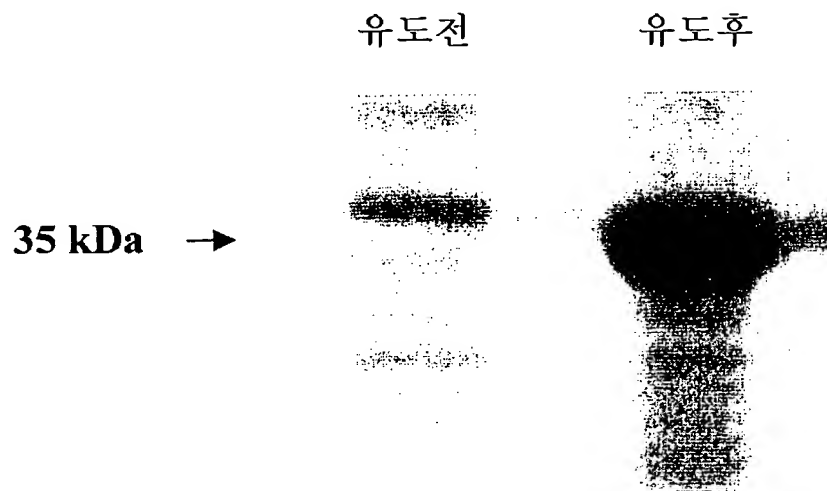
【도 8】



【도 9】



【도 10】



【서열목록】

<110> KIM, Jin Woo <120> Novel oncogene <130> kjw-0451
 <160> 1 <170> KOPATIN 1.5 <210> 1 <211> 2118
 <212> DNA <213> Homo sapiens <220> <221> CDS
 <222> (9)..(1088) <220> <221> sig_peptide <222>
 (9)..(83) <220> <221> misc_feature <222> (435)..(494)
 <223> transmembrane domain <400> 1 ctgtgaag atg gcg ctc tcc agg
 gtg tgc tgg gct cgg tcg gct gtg tgg 50 Met Ala Leu Ser Arg Val Cys
 Trp Ala Arg Ser Ala Val Trp 1 5 10
 ggc tcg gca gtc acc cct gga cat ttt gtc acc cgg agg ctg caa ctt 98 Gly Ser
 Ala Val Thr Pro Gly His Phe Val Thr Arg Arg Leu Gln Leu 15 20
 25 30 ggt cgc tct ggc ctg gct tgg ggg gcc cct cgg tct tca aag ct
 cac 146 Gly Arg Ser Gly Leu Ala Trp Gly Ala Pro Arg Ser Ser Lys Leu His

35 40 45 ctt tct cca aag gca gat gtg aag aa
 ttg atg tct tat gtg gta acc 194 Leu Ser Pro Lys Ala Asp Val Lys Asn Leu Met
 Ser Tyr Val Val Thr 50 55 60
 aag aca aaa gcg att aat ggg aaa tac cat cgt ttc ttg ggt cgt cat 242 Lys Thr
 Lys Ala Ile Asn Gly Lys Tyr His Arg Phe Leu Gly Arg His 65
 70 75 ttc ccc cgc ttc tat atc ctg tac aca atc ttc at
 aaa gga ttg cag 290 Phe Pro Arg Phe Tyr Ile Leu Tyr Thr Ile Phe Met Lys Gly
 Leu Gln 80 85 90 atg tt
 tgg gct gat gcc aaa aag gct aga aga ata aag aca aat atg 338 Met Leu Trp Ala
 Asp Ala Lys Lys Ala Arg Arg Ile Lys Thr Asn Met 95 100
 105 110 tgg aag cac aat ata aag ttt cat caa ctt cca tac cgg gag
 atg gag 386 Trp Lys His Asn Ile Lys Phe His Gln Leu Pro Tyr Arg Glu Met Glu
 115 120 125 cat ttg aga cag ttc cgc caa gac
 gtc acc aag tgt ctt ttc cta ggt 434 His Leu Arg Gln Phe Arg Gln Asp Val Thr
 Lys Cys Leu Phe Leu Gly 130 135 140
 att att tcc att cca cct ttt gcc aac tac ctg gtc ttc ttg cta atg 482 Ile Ile
 Ser Ile Pro Pro Phe Ala Asn Tyr Leu Val Phe Leu Leu Met 145
 150 155 tac ctg ttt ccc agg caa cta ctg atc agg cat
 ttc tgg acc cca aaa 530 Tyr Leu Phe Pro Arg Gln Leu Leu Ile Arg His Phe Trp
 Thr Pro Lys 160 165 170 ca
 caa act gat ttc tta gat atc tat cat gct ttc cgg aag cag tcc 578 Gln Gln Thr

Asp Phe Leu Asp Ile Tyr His Ala Phe Arg Lys Gln Ser 175 180
 185 190 cac cca gaa att att agt tat tta gaa aag gtc atc cct ctc
 att tct 626 His Pro Glu Ile Ile Ser Tyr Leu Glu Lys Val Ile Pro Leu Ile Ser
 195 200 205 gat gca gga ctc cgg tgg cgt ctg
 aca gat ctg tgc acc aag ata cag 674 Asp Ala Gly Leu Arg Trp Arg Leu Thr Asp
 Leu Cys Thr Lys Ile Gln 210 215 220
 cgt ggt acc cac cca gca ata cat gat atc ttg gct ctg aga gag tgt 722 Arg Gly
 Thr His Pro Ala Ile His Asp Ile Leu Ala Leu Arg Glu Cys 225
 230 235 ttc tct aac cat cct ctg ggc atg aac caa ctc
 cag gct ttg cac gtg 770 Phe Ser Asn His Pro Leu Gly Met Asn Gln Leu Gln Ala
 Leu His Val 240 245 250 aa
 gcc ttg agc cgg gcc atg ctt ctc aca tct tac ctg cct cct ccc 818 Lys Ala Leu
 Ser Arg Ala Met Leu Leu Thr Ser Tyr Leu Pro Pro Pro 255 260
 265 270 ttg ttg aga cat cgt ttg aag act cat aca act gtg att cac
 caa ctg 866 Leu Leu Arg His Arg Leu Lys Thr His Thr Thr Val Ile His Gln Leu
 275 280 285 gac aag gct ttg gca aag ctg ggg
 att ggc cag ctg act gct cag gaa 914 Asp Lys Ala Leu Ala Lys Leu Gly Ile Gly
 Gln Leu Thr Ala Gln Glu 290 295 300
 gta aaa tcg gct tgt tat ctc cgt ggc ctg aat tct acg cat att ggt 962 Val Lys
 Ser Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Leu Asn Ser Thr His Ile Gly 305
 310 315 gaa gat agg tgt cga act tgg ctg gga gaa tgg

ctg cag att tcc tgc 1010 Glu Asp Arg Cys Arg Thr Trp Leu Gly Glu Trp Leu Gln
 Ile Ser Cys 320 325 330 ag
 ctg aaa gaa gct gag ctg tct ctc ttg ctg cac aac gtg gtc ctg 1058 Ser Leu Lys
 Glu Ala Glu Leu Ser Leu Leu Leu His Asn Val Val Leu 335 340
 345 350 ctc tcc acc aac tac ctt ggg aca agg cgc tg aatgaacct
 ggagcggatg 1110 Leu Ser Thr Asn Tyr Leu Gly Thr Arg Arg
 355 360 gcattgtcct gcagtcgtat agtatagcag
 tgcaggaaca aacagcactt gccagcaaag 1170 tctgtgtgta ctgttaagt tgtgggaggc agagagagg
 gcagggggcca tgggcttcac 1230 agcatggcac acctgtggga actgcagaca ttctctcac agctagaac
 gaaacaaacc 1290 ctcttgctag ggggtgtccg tgtgaggtgt catcctgtcc cctcataat tactaatag
 1350 tggaactggc agcagcctct actgggcttt tactgtgatg tgttcagttc atgtcctagg 1410
 aagtcagctt ttgccccagg tgggaatcct tatttggtt aggactgatc cacttccatg 1470 ttacttaca
 ctgtgggttt ttgtgttgc tgtagaaaa tttttggctg gtgaaaacag 1530 cactcctttg gctggagca
 ttgtgtccat gcatgtactt ggggtgttcc ctccatcctt 1590 tctgatatga ccaaaaatca agttgtttt
 tttttgtca ctttactgg catgggctaa 1650 ccacttcttt ttcaaaccct ctgaacacct ttttctgat
 ggtaacttgc agaatattc 1710 tattggaaaa gataacagga agtacaagt cttcttgacc ctttctca
 tgtttctagc 1770 cttcactctc cattgtcttt tctgggctgt attacagccc tctgtggatc ttcaactct
 1830 ctgcctccac tgtgatgcag cagtccaact gtaactgaca gtggctgcct tctctgggcc 1890
 atggatcaca cctgtaaggt actaattact gccagcctg gggagatcag gagaggtctg 1950 catagttag
 aagttgggtt tagcttttgt gtgtgcatca gtgacttaga gttctgtaat 2010 aacttattgt aaatgcatg
 agcactgttt ttaaacccaa gtaaagactg cttgaaacct 2070 gttgatggaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa

aaaaaaaaa aaaaaaaaa

2118 <210> 2 <211> 360 <212>

PRT <213> Homo sapiens <400> 2 Met Ala Leu Ser Arg Val Cys Trp Ala Arg

Ser Ala Val Trp Gly Ser 1 5 10 15

Ala Val Thr Pro Gly His Phe Val Thr Arg Arg Leu Gln Leu Gly Arg 20

25 30 Ser Gly Leu Ala Trp Gly Ala Pro Arg Ser Ser Lys Leu

His Leu Ser 35 40 45 Pro Lys

Ala Asp Val Lys Asn Leu Met Ser Tyr Val Val Thr Lys Thr 50 55

60 Lys Ala Ile Asn Gly Lys Tyr His Arg Phe Leu Gly Arg His Phe Pro

65 70 75 80 Arg Phe Tyr Ile Leu

Tyr Thr Ile Phe Met Lys Gly Leu Gln Met Leu 85 90

95 Trp Ala Asp Ala Lys Lys Ala Arg Arg Ile Lys Thr Asn Met Trp Lys

100 105 110 His Asn Ile Lys Phe His Gln Leu

Pro Tyr Arg Glu Met Glu His Leu 115 120 125

Arg Gln Phe Arg Gln Asp Val Thr Lys Cys Leu Phe Leu Gly Ile Ile 130

135 140 Ser Ile Pro Pro Phe Ala Asn Tyr Leu Val Phe

Leu Leu Met Tyr Leu 145 150 155 160

Phe Pro Arg Gln Leu Leu Ile Arg His Phe Trp Thr Pro Lys Gln Gln 165

170 175 Thr Asp Phe Leu Asp Ile Tyr His Ala Phe Arg Lys Gln Ser

His Pro 180 185 190 Glu Ile Ile

Ser Tyr Leu Glu Lys Val Ile Pro Leu Ile Ser Asp Ala 195 200

205 Gly Leu Arg Trp Arg Leu Thr Asp Leu Cys Thr Lys Ile Gln Arg Gly

210	215	220	Thr His Pro Ala Ile His
Asp Ile Leu Ala Leu Arg Glu Cys Phe Ser 225	230	235	
240 Asn His Pro Leu Gly Met Asn Gln Leu Gln Ala Leu His Val Lys Ala			
245	250	255	Leu Ser Arg Ala Met Leu Leu Thr Ser
Tyr Leu Pro Pro Pro Leu Leu	260	265	270
Arg His Arg Leu Lys Thr His Thr Thr Val Ile His Gln Leu Asp Lys	275		
280	285	Ala Leu Ala Lys Leu Gly Ile Gly Gln Leu Thr Ala	
Gln Glu Val Lys	290	295	300 Ser
Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Leu Asn Ser Thr His Ile Gly Glu Asp 305			310
315	320 Arg Cys Arg Thr Trp Leu Gly Glu Trp Leu Gln Ile Ser Cys Ser		
Leu	325	330	335 Lys Glu Ala Glu
Leu Ser Leu Leu Leu His Asn Val Val Leu Leu Ser		340	345
350	Thr Asn Tyr Leu Gly Thr Arg Arg	355	360